Gedruckt mit Unterstützung aus dem Jerome und Margaret Stonborough-Fonds

Über das Verhalten der Froschlymphe gegen artfremdes Blut

Von

Hedwig Herrmann (Wien)

(Mit 6 Textfiguren)

(Vorgelegt in der Sitzung vom 10. März 1927)

Einleitung.

Die bisherigen Untersuchungen an Froschlymphe galten hauptsächlich den in der Lymphflüssigkeit suspendierten Leukocyten und haben sich fast ausschließlich auf deren verdauende und phagocytäre Eigenschaften erstreckt. Der Flüssigkeit selbst hat man keine besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Versuche, bei denen artfremde, frische Blutkörperchen mit Froschlymphe in Berührung gebracht wurden, zeigen jedoch, daß auch die Lymphflüssigkeit Fremdkörpern gegenüber eine aktive Rolle spielen kann.

Verhalten der Froschlymphe gegen frische, rote Blutkörperchen.

Für die folgenden Versuche wurde einem Frosch mit einer kleinen Schere eine kleine Öffnung in die Rückenhaut geschnitten, durch welche mit einer fein ausgezogenen Pipette die zu beobachtenden Partikel, in Frosch-Ringer oder physiologischer Kochsalzlösung suspendiert, injiziert wurden. Nach einer bestimmten Zeit wurde dem Frosch durch dieselbe Öffnung mit einer Kapillare etwas Lymphe entnommen und untersucht.

Die folgende Tabelle bringt in übersichtlicher Form das Verhalten der Lymphe gegen frische, rote Blutkörperchen:

Datum	Vorgang des Versuches	Ergebnis
7. XII. Vormittags.	Pferdeblutkörperchen in physiologischer Kochsalzlösung injiziert.	Nachmittags: In der Lymphe keine Blutkörperchen zu finden.
10. XII. $10^h\,50^m$	Rote Blutkörperchen vom Menschen in physiologischer Kochsalzlösung injiziert.	$10^h\,55^m$, nicht sehr viele Blutkörperchen.
		$11^h\,5^m$, weniger Blutkörperchen.
		$11^h\,15^m$, keine roten Blutkörperchen.

Aus diesen orientierenden Untersuchungen geht hervor, daß nach längerer oder kürzerer Zeit die injizierten Blutkörperchen in der Lymphe nicht zu sehen sind. Ebenso zeigt eine Untersuchung des Froschblutes, daß sie auch im kreisenden Blut nicht nachweisbar sind, daß sie also nicht in die Blutbahn gelangen.

Es lag nahe, anzunehmen, daß die Blutkörperchen von den Leukocyten, dem Verhalten gegen andere Fremdkörper entsprechend, aufgenommen würden. Es waren jedoch niemals von Leukocyten eingeschlossene Blutkörperchen zu finden, während ein Kontrollversuch zeigte, daß die Leukocyten desselben Frosches mit Jodjodkalium gefärbte Reisstärke stark aufnahmen:

Datum	Vorgang des Versuches	Ergebnis
13. XII.	Mit Jodjodkalium gefärbte Reisstärke in Kaltblut-Ringer injiziert.	16^h 40^m, starke Aufnahme. 18^h 30^m, sehr starke Aufnahme. Manche Leukocyten haben bis zu fünf Stärkekörner aufgenommen.

Durch vorstehende Untersuchungen ergibt sich also, daß artfremde, frische rote Blutkörperchen von den Leukocyten nicht aufgenommen werden, daß anderseits die Injektion keine Schädigung der Leukocyten in ihrer phagocytären Eigenschaft verursacht, daß die fremden roten Blutkörperchen weder durch Resorption in die Blutbahn gelangen, noch mikroskopisch in der Lymphe nachweisbar sind.

Es mußte nun noch untersucht werden, ob die roten Blutkörperchen nicht durch ihre Berührung mit der Lymphflüssigkeit eine Veränderung erfahren, wodurch sie bei der mikroskopischen Untersuchung im Hellfelde nicht nachweisbar erscheinen. Eine Untersuchung im Dunkelfelde bestätigt auch tatsächlich diese Annahme: es waren in der Lymphe im Dunkelfelde zahlreiche Blutkörperchen zu sehen; die Blutkörperchen werden also durch Lymphe hämolysiert und im Dunkelfelde ist nur das Stroma des Blutkörperchens als schwache Kontur zu sehen, während das Hämoglobin aufgelöst wird und das Blutkörperchen deswegen im Hellfelde nicht mehr oder nur ganz schwach zu sehen ist. Der Schatten ist im Dunkelfelde als schwacher, doppeltkonturierter Ring zu sehen, während bei dem erhaltenen Blutkörperchen dessen ganze Fläche stark glänzend erscheint.

Die Blutkörperchen des Säugetieres werden also hämolysiert. Eine Aufnahme durch Leukocyten kann offenbar nicht erfolgen, da die Blutkörperchen vorher aufgelöst werden. Blutschatten in den Leukocyten waren nicht zu sehen; ob sie nicht aufgenommen werden oder nur nicht sichtbar sind, ließ sich mikroskopisch nicht entscheiden.

Datum	Vorgang des Versuches	Ergebnis
19. XII.	Pferdeblutkörperchen in physiologischer Kochsalzlösung injiziert.	$16^h\ 35^m$, viele rote Blutkörperchen.
		17^h, weniger rote Blutkörperchen, viele Leukocyten, keine Aufnahme, viele Blutschatten.
		$17^h\ 35^m$, keine roten Blutkörperchen, viele Leukocyten, keine Aufnahme, reichlich Blutschatten.

Es war nun zu untersuchen, ob sich diese Eigenschaft der Lymphe nur auf das Blut der Warmblüter bezieht, oder ob sie sich gegen das Blut der Kaltblüter in gleicher Weise verhält. Um diese Frage zu untersuchen, wurden Blutkörper folgender Vertreter der verschiedenen Tierklassen untersucht:

Amphibien.	III.	Frosch.	3. III. Zum Teil gut erhalten, zum Teil Gestaltveränderung, keine Hämolyse.
	30. III. $11^h\ 5^m$.	Molch.	$11^h\ 35^m$, einfach konturierte Schatten, die im Hellfelde noch ganz schwach sichtbar sind, zum Teil gezackt, Kern randständig.
Reptilien.	6. II. 12^h.	Schildkröte.	$17^h\ 30^m$, Schatten um die Kerne zu sehen, Kern tritt deutlich hervor, zum Teil abgerundet, zum Teil normale Form.
Fische.	19. I. 17^h.	Hecht.	18^h, zahlreiche Kerne, teils mit Schatten, teils allein.
Säugetiere.	26. I. $11^h\ 40^m$.	Ratte.	$11^h\ 50^m$, schon einige Schatten, zum Teil noch gut erhalten.
			$12^h\ 40^m$, mehr Schatten.
	22. I. $11^h\ 50^m$.	Katze.	12^h, $12^h\ 10^m$, } beginnende Schattenbildung.
			$17^h\ 30^m$, viele Schatten, teilweise noch erhaltene Blutkörperchen.
			18^h, sehr zahlreiche Schatten.

Säugetiere.	24. I. 11h 15m.	Affe.	11h 30m, 11h 45m, viele Schatten, die im Hellfelde noch schwach zu erkennen sind. 12h, 12h 40m, viele Schatten, die meisten im Hellfelde nicht mehr zu sehen, einige noch ganz schwach zu sehen.
	17. II. 17h 30m.	Mensch.	17h 37m, kein einziges Blutkörperchen erhalten, zahlreiche Schatten.

Wir sehen also, daß alle Blutarten, mit Ausnahme der eigenen, einer Hämolyse unterliegen. Es zeigt sich auch, daß sich eine Reihe der Resistenz nach aufstellen läßt, in dem Sinne, daß im großen und ganzen die Resistenz desto geringer ist, je entfernter die Verwandtschaft wird. Die menschlichen Blutkörperchen besitzen die weitaus geringste Resistenzfähigkeit, doch können diese Versuche keineswegs als maßgebend zur Aufstellung einer genauen Resistenzreihe angesehen werden, wie dies anderen hämolytisch wirkenden Agenzien gegenüber geschehen ist (Krüger,[1] Rywosch[2]), da hier die Verschiedenheit in der Menge der eingespritzten Blutkörperchen und die Menge der eben im Rückenlymphsack enthaltenen Lymphe Ungenauigkeiten hervorrufen muß. Dieser Hinweis ist also nur als beiläufig zutreffend gedacht, da noch andere Momente, wie etwa Größe, Abkühlung etc. für die verschiedene Resistenzfähigkeit in Betracht kommen können.

Es war nun naheliegend, anzunehmen, daß die Hypotonie der Froschlymphe Ursache für die Hämolyse ist; daß das aber nicht der Fall ist, beweist der Umstand, daß sich alle diese Blutarten in Frosch-Ringer, der ja mit der Froschlymphe isotonisch ist, unbeschädigt mehrere Tage hindurch erhalten. Die Annahme, ob ein Ferment irgendeiner Art Ursache der Hämolyse ist, ließ sich dadurch erweisen, daß die gekochte Lymphe die Blutkörperchen nicht hämolysierte.

Welcher Art dieses Ferment ist, konnte ich in den Untersuchungen, die ich vornahm, nicht feststellen, jedoch sollen einige Angaben darüber noch weiter unten folgen.

Es findet also binnen kurzer Zeit eine Zerstörung der in den Rückenlymphsack gebrachten Blutkörperchen statt; auch die Schatten verschwinden nach einiger Zeit; wahrscheinlich wird das Gerüst auch zerstört. Außerhalb des Froschkörpers lassen sich dieselben

---

[1] Krüger, Vergleichende Untersuchungen über die Resistenz des Hämoglobins verschiedener Tiere. Zeitschrift für vergleichende Physiologie, II. Bd., III. H., 1925.

[2] Rywosch, Pflüger's Archiv, *116*, 1907, 229.

Resultate erzielen; einige dieser Versuche wurden auch in der Eprouvette mit denselben Resultaten durchgeführt, was aber die methodische Schwierigkeit hat, daß unter normalen Verhältnissen nur ganz geringe Mengen von Lymphe aus dem Rückenlymphsack zu gewinnen sind.

Es hat demnach die Froschlymphe die Fähigkeit, ohne vorhergehende Immunisierung hämolytisch zu wirken, wie es nach Landois[1] sonst nur das Serum des Frosches und des Hundes gegen Kaninchenblutkörperchen und nach Camus und Gley[2] das Serum des Aales in weitem Umfange besitzt, während andere Sera die Fähigkeit der Hämolyse nur durch Vorbehandlung des Tieres gewinnen. Es scheint jedoch die Fähigkeit, fremde Blutkörperchen zu lösen, auch anderen Fischarten zuzukommen, wenn vielleicht auch in geringerem Maße als dem Serum des Aales. Ich setzte einem $^1/_2$ *cm*^{3} Serum eines Karpfens und eines Welses einen Tropfen Menschenblut zu und fand nach einer halben Stunde bereits alle Blutkörperchen hämolysiert. Abgesehen davon, besitzen auch die Sera mancher Säuger und des Menschen gegen bestimmte Blutkörperchen Normalhämolyse. So fand Polano,[3] daß menschliches Serum Taubenblut zu lösen imstande ist und Kreidl und Mandl[4] berichten, daß Ziegenserüm eine ganze Reihe fremder Blutarten (Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Affe) löst, während Rinder- und Schafblut nicht gelöst werden.

Um die hämolytischen Fähigkeiten des Froschserums und der Froschlymphe zu vergleichen, setzte ich gleichen Mengen von Serum und Lymphe je einen Tropfen Menschenblut zu und fand, daß nach ziemlich gleicher Zeit vollständige Hämolyse eingetreten war.

Verhalten der Froschlymphe gegen fixierte Blutkörperchen.

Da frische, rote Blutkörperchen von Froschleukocyten nicht aufgenommen werden, weil sie von der Lymphe sehr bald zerstört werden, so war es von Interesse zu sehen, wie sich die Leukocyten verhalten, wenn man der Lymphe die Blutkörperchen im fixierten Zustande, also als totes Material, zusetzt.

Um fixierte, rote Blutkörperchen zu erhalten, wurde das Blut verschiedener Tiere in 40% Formaldehyd aufgefangen und mit alkohollöslichem Eosin gefärbt; dann wurden die Blutkörperchen so lange gewaschen, bis die über dem Sediment stehende Flüssigkeit farblos war, und schließlich in einer Suspension in Frosch-Ringer auf dieselbe Art wie die frischen Blutkörperchen in den Rückenlymphsack gebracht.

---

[1] Landois, Lehrbuch der Physiologie des Menschen, 1923.

[2] Camus und Gley, Referat über die 1912 in Paris erschienene Arbeit im Zentralblatt für Physiologie, 1914, p. 861.

[3] Polano, Experimentelle Beiträge zur Biologie der Schwangerschaft, Würzburg 1904.

[4] Kreidl und Mandl, Experimentelle Beiträge zu den physiologischen Wechselbeziehungen zwischen Fötus und Mutter. Akad. d. Wiss. in Wien, math.-naturw. Kl., CXIII, Abt. III, 1904.

Um eine Kontrolle über den Zustand der Leukocyten zu haben, wurden die fixierten Blutkörperchen zunächst mit gefärbter Reisstärke gemischt, zugesetzt, da die Reisstärke bekanntlich sehr gierig von den Leukocyten aufgenommen wird. Es wurden Pferdeblutkörperchen mit Stärkekörnern gemischt injiziert, und beide waren nach einer Stunde von den Leukocyten stark aufgenommen. Es ließ sich im Versuche zeigen, daß fixierte Blutkörperchen von den Froschleukocyten aufgenommen werden, also wie gewöhnliche Fremdkörper

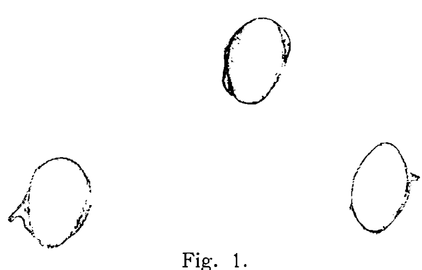


Fig. 1.

behandelt werden. Eine Bevorzugung oder Benachteiligung der Blutkörperchen anderen Fremdkörpern gegenüber besteht nicht.

Die Pferdeblutkörperchen besitzen eine derartige Größe, daß sie von Leukocyten leicht aufgenommen werden können. Einige Leukocyten haben sogar 4 bis 5 fixierte Blutkörperchen aufgenommen. Ebenso verhält es sich mit fixierten Katzenblutkörperchen. Um zu untersuchen, bis zu welcher Größe die Leukocyten imstande sind, Fremdkörper aufzunehmen, wurden Versuche mit fixierten Frosch-

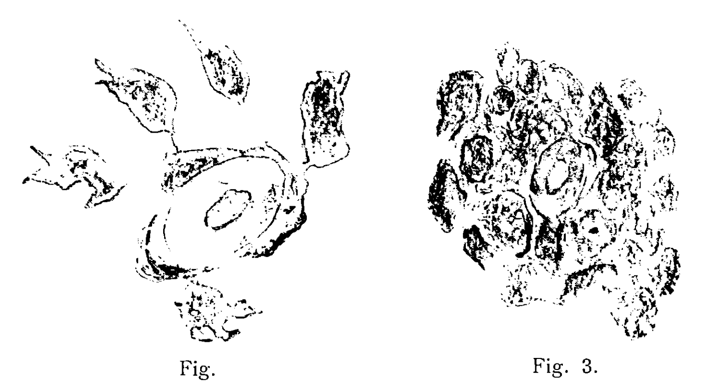


Fig. Fig. 3.

und Salamanderblutkörperchen angestellt, welchen ein Versuch mit Kartoffelstärke vorausging; bei diesem Vorversuche wurden Stärkekörner bis zu einer Größe von 37 μ aufgenommen. Das Aussehen eines Leukocyten, der ein solches Stärkekorn aufgenommen hatte, war ein derartiges, daß das Stärkekorn von einem ganz schmalen Saum umgeben war, der den Anteil des Leukocyten darstellte. Es war dies auf den ersten Blick kaum zu erkennen und wurde erst bei längerer Betrachtung klar, als sich die Gestalt dieses Saumes

immerwährend änderte. Als nun fixierte Froschblutkörperchen in die Lymphe gebracht wurden, deren Längsdurchmesser 27 bis 30 μ beträgt, die also in der Größe den eben beschriebenen aufgenommenen Stärkekörnern entsprechen, fand sich in einigen Fällen eine Aufnahme der Blutkörperchen (Fig. 1), doch lange nicht so häufig, wie bei den kleineren Arten, die von Leukocyten leicht bewältigt werden.

Da die Blutkörperchen vom Salamander noch größer sind, einen Längsdurchmesser von 45 bis 51 μ besitzen, ließ sich durch Versuche mit diesen die Frage beantworten, ob noch größere Fremdkörper, als die bisher genannten, phagocytiert werden können, oder wie sich die Leukocyten sonst gegen diese Blutkörperchen verhalten. In diesem Falle fand sich nun folgendes Verhalten:

Die Blutkörperchen waren von einer größeren Zahl von Leukocyten dicht umgeben, ohne daß man diese Umlagerung als Auf-

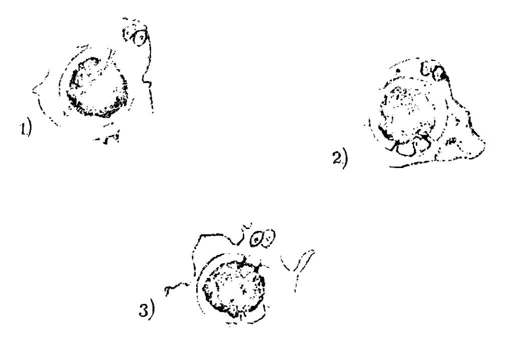


Fig. 4.

nahme bezeichnen konnte (Fig. 2). Es war bald kein Blutkörperchen zu finden, das nicht von mindestens zwei Leukocyten umgeben gewesen wäre. Die Zahl der Leukocyten, die ein Blutkörperchen umgaben, war meist schwer zu bestimmen, da durch die dichte Lagerung nicht alle Konturen zu erkennen waren (Fig. 3). Es fanden sich Bilder, bei denen einige Blutkörperchen in einer konturlosen Masse von Leukocyten dicht eingebettet waren. Eine Aufnahme eines Salamanderblutkörperchens durch einen einzigen Leukocyten konnte nur in einem Falle festgestellt werden. Es scheint die Aufnahme so großer Partikel wohl hie und da möglich, aber nicht das gewöhnliche Verhalten zu sein.

Etwas anders verhielt sich die Lymphe, die nach einer Injektion einer Suspension von Aleuronatkörnern in Ringer entstand. Diese Injektion wurde vorgenommen, um größere Mengen von Lymphe zu erhalten, da Aleuronat als lympherzeugendes Mittel bekannt ist. In dieser Lymphe fanden sich Aleuronatkörper in der Größe von Froschblutkörperchen, welche derartig eingeschlossen waren, daß ein breiter Leukocytenrand das Korn umgab (Fig. 4). Merkwürdigerweise fanden sich in dieser Lymphe große Zellen, wie sie Figur 5 zeigt,

die keine größeren Einschlüsse enthielten und überhaupt keine besondere phagocytäre Eigenschaft zu besitzen schienen. Sie haben eine Größe von 13·5 bis 32·5 μ, sind also durchschnittlich doppelt so groß wie die normalen Leukocyten, deren Aussehen Figur 6 zeigt, sind stets rund, haben ein gar nicht oder schwach granuliertes Plasma und stets einen sehr deutlichen Kern. Eine Färbung nach May-Grünwald zeigte, daß sich das Plasma dieser Leukocyten basophil färbt. Welche Rolle diese Leukocyten in der Aleuronatlymphe spielen und ob sie mit dem in Figur 4 geschilderten, phagocytären Verhalten im Zusammenhange stehen, war durch die geschilderten Untersuchungen nicht zu entscheiden; es soll daher lediglich das Auftreten dieser Zellformen festgestellt sein.



Fig. 5. Fig. 6.

Nach einigen Tagen war kein freies, fixiertes Blutkörperchen in der Lymphe zu finden, wohl aber ließen sie sich in der Leber und in der Milz nachweisen. Ob die Blutkörperchen in Kapillaren der Leber, in ihren Lymphräumen, oder zwischen ihren Zellen stecken, konnte nach den Gefrierschnitten, die angefertigt wurden, nicht entschieden werden.

Einige Angaben über das Hämolysin der Froschlymphe.

In der Angabe von Landois über die hämolytische Wirkung des Froschserums findet sich nichts Näheres über die Natur des Hämolysins. Bei der Froschlymphe ließ sich zeigen, daß bei einer Temperatur von 40° eine Verlangsamung der Hämolyse eintritt und daß die Lymphe bei einer Temperatur von 55° ihre hämolytische Wirksamkeit verliert, wie das auch für das Aalserum von Camus und Gley (siehe p. 6) angegeben wird. Wie sich leicht nachweisen läßt, verliert auch das Froschserum bei 55° seine hämolytische Wirksamkeit, verhält sich also diesbezüglich wie die Lymphe.

Da in der Aleuronatlymphe nach 24 Stunden ein tryptisches Ferment auftritt, blieb noch zu untersuchen, ob nicht vielleicht tryptisches Ferment auch imstande ist, hämolytisch zu wirken und dadurch die hämolytische Wirkung der Lymphe zu steigern. Zu 1 cm^3 einer Lösung von Pankreatin in Ringer, im Verhältnisse 1:5000,

fügte ich einen Tropfen Menschenblut hinzu und stellte diese Mischung in den Brutschrank, der eine Temperatur von 37° hatte. Es trat auch nach mehreren Stunden keine Hämolyse ein, hingegen gingen mit den Blutkörperchen Veränderungen vor sich, indem sie grünlich und granuliert wurden. Schatten, wie sie in der Lymphe zu finden waren, gab es nicht. Es scheint also die Hämolyse in keiner Beziehung zu den Verdauungsfermenten zu stehen, was auch aus dem Umstande hervorgeht, daß normale Lymphe und normales Serum keine tryptischen Fermente enthalten und dennoch hämolytisch wirken.

Zusammenfassung.

1. Die Lymphe des Frosches wirkt ohne Vorbehandlung auf alle Blutarten, mit Ausnahme der eigenen, hämolytisch.
2. In den Rückenlymphsack gebrachte Fremdkörper unterliegen entweder der Wirkung der Lymphflüssigkeit als solcher, oder der in ihr suspendierten, korpuskulären Elemente (Phagocytose).
3. Die Lymphe verdankt ihre hämolytische Fähigkeit einem Hämolysin, das bei 55° zerstört wird.
4. Sämtliche Blutkörperchen, die im frischen Zustande einer Hämolyse unterliegen, werden im fixierten Zustande von den Leukocyten bewältigt. Blutkörperchen, deren Größe eine Aufnahme durch die Leukocyten leicht gestattet, werden aufgenommen, größere werden von zahlreichen Leukocyten umlagert.
5. Es können Fremdkörper bis zu einer Größe von 30 μ (fixierte Blutkörperchen des Frosches) phagocytiert werden.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Kreidl und seinem Assistenten, Herrn Dr. Nirenstein möchte ich an dieser Stelle für die Anregung zu dieser Arbeit und ihre freundliche Hilfe herzlichst danken.